

## 항-Porphyrromonas gingivalis heat shock protein 60 단클론항체의 생성과 특성 규명

이지영, 이주연, 김성조, 최점일\*

부산대학교 치의학전문대학원 치주과학교실

### Production and characterization of cross-reactive anti-*Porphyrromonas gingivalis* heat shock protein 60 monoclonal antibody

Ji-Young Lee, Ju-Youn Lee, Seong-Jo Kim, Jeom-Il Choi

Department of Periodontology, School of Dentistry, Pusan National University

#### ABSTRACT

**Purpose:** *Porphyrromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) heat shock protein (HSP)60 may play a role in the immunopathogenesis of periodontitis as well as atherosclerosis by modulating autoimmune reaction due to its high level of sequence homology between bacteria and human counterpart. The purpose of this study was to identify immunodominant epitope of *P. gingivalis* HSP60 that is reactive exclusively to the homologous bacteria without reacting with human HSP.

**Materials and methods:** The present study was performed to identify the peptide specifically recognized by anti-*P. gingivalis* HSP60 monoclonal antibodies mono-reactive to *P. gingivalis* HSP60.

**Results:** Four different hybridomas were cloned producing monoclonal IgG antibodies exclusively to *P. gingivalis* HSP60. Thirty seven synthetic peptides (20-mer with 5-amino acid overlapping) were synthesized. All of these peptide were subject to SDS-PAGE for immunoblot analysis. One peptide (TVPGGGTTYIRAIAALEGLK) and the other peptide (TLVVNRLRGLSKICAVKAPG) were recognized by all and one of the four monoclonal antibodies, respectively, that reacted solely with *P. gingivalis* HSP60. Immunohistochemistry to identify the localization of the HSP60 in the diseased gingival tissues revealed that all of the four monoclonal antibodies were highly reacted with the diseased gingival tissue than normal gingival tissue.

**Conclusion:** The *P. gingivalis* HSP60 peptides (TVPGGGTTYIRAIAALEGLK and TLVVNRLRGLSKICAVKAPG, respectively) are positively involved in the immunopathologic process of periodontal disease. The peptide may potentially be developed as vaccine candidates. Further investigations are under way to identify more clones producing monoclonal antibodies reactive to *P. gingivalis* HSP and to other periodontopathogenic bacteria as well, while maintaining specificities to human counterpart. (*J Korean Acad Periodontol* 2008;38:565-578)

**KEY WORDS:** epitope; anti-*P.gingivalis* HSP60; monoclonal antibody; periodontitis.

## 서론

치주질환은 가장 주요한 세균 *Porphyrromonas gingiva-lis*(*P. gingivalis*)를 포함하여 다양한 병인균을 가지는 만성

염증질환이다. 세균감염에 의해 야기되는 치주염의 심도는 치주병인균의 세포자체 혹은 세균성 항원으로 면역시킬 때 감소된다는 여러 동물 실험 결과들이 보고되었다<sup>1-5)</sup>. 그러나 인간에 있어 치주염은 병인균이 다양하고, 세균의 항원결정 부위가 인체조직의 항원결정부위와 교차 반응할 위험이 크므로 백신의 개발에 어려움이 있다<sup>2,6-8)</sup>. 이런 문제점을 고려해 볼 때 치주염에 대한 백신개발 전략에 있어서 높은 서열 상동성(sequence homology)을 가지면서 세균 간 상호 교차 인지하는 항원을 찾는 것이 중요한데, 열충격단백(heat shock protein: HSP)이 이에 가장 적합하다. 진핵 및 원핵세포가 다양한 스트레스 환경에 노출되었을 때 HSP

Correspondence: Dr, Jeom-Il Choi

Department Periodontology, School of Dentistry, Pusan national University, 1-10, Ami-dong, Seo-gu, Pusan, 602-739, Korea.

E-mail: jrapa@pusan.ac.kr, Tel: 82-51-240-7459, Fax: 82-51-243-7606

이 논문은 부산대학교 2007년도 임상연구비, 2007년도 지역대학우수과학자 지원사업(E00130), 2008년도 보건복지부 보건의료개발사업 협동중개연구(A080391), 2008년도 의학연구소 지원 연구과제의 지원에 의하여 연구되었음.

Received: Jun 13, 2008; Accepted: Sep. 9, 2008

를 포함하는 스트레스 단백질의 생성이 증가한다. HSP는 단백질의 folding과 translocation을 촉진시키며 독성단백질이 분해될 때 protease로 작용한다. HSP60은 여러 세균간의 공통항원으로 발견되었고, 아미노산 서열의 상동성이 세균간에 매우 높은 것으로 알려진 바 있다<sup>9,10</sup>.

HSP 유전자는 *P. gingivalis*<sup>11</sup>, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*)<sup>12</sup>, *Tannella forsythia* (*T. forsythia*), *Treponema denticola* (*T. denticola*)<sup>13</sup>, *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*)<sup>14</sup>, *Campylobacter rectus* (*C. rectus*)<sup>15</sup>와 *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*)<sup>16</sup> 등에서 광범위하게 클론 되었다. 여러 치주병인균의 HSP 중에서 다음 몇 가지의 이유로 *P. gingivalis* HSP를 연구대상으로 선택하였다: 1) *P. gingivalis*는 만성파괴성 치주염에서 가장 중요한 병인균의 하나로 밝혀졌다<sup>17</sup>. 2) 치주염 환자 및 치주염을 가진 동맥경화증 환자에서 *P. gingivalis* HSP60에 대한 항체 반응이 건강한 사람에서보다 유의하게 높다고 보고된 바 있다<sup>18,19</sup>. 3) 치주염 환자 및 동맥경화증 환자에서 *P. gingivalis* HSP에 특이하게 반응하는 T cell line을 규명하였다<sup>18,19</sup>. 4) *P. gingivalis* HSP-특이 항혈청은 동물실험에서 다른 치주병인균의 HSP를 교차 인지하는 동시에 교차 식균 능력을 보유한다는 보고가 있다<sup>20</sup>. 이런 결과들을 종합해 볼 때 *P. gingivalis* HSP는 다양한 치주병인균을 교차 방어할 수 있는 효과적인 치주백신으로 활용될 수 있다고 추정된다.

한편, HSP는 치주염 및 동맥경화증의 자가 면역기전에 깊게 관계하는 것으로 생각되는데<sup>21-23</sup>, 이는 세균성 HSP가 인체 HSP와 높은 배열 상동성을 공유하기 때문이다. 치주염 환자에서 *P. gingivalis* HSP60에 대한 항체 반응이 증가하는 것은 *P. gingivalis* HSP60이 치은섬유모세포와 혈관내피세포를 표적으로 하는 치주 조직의 자가 면역성 파괴에 관여할 가능성을 보여주는 것이다<sup>18</sup>. 그리고 *P. gingivalis* HSP60에 대한 IgG 항체역가가 증가된 동맥경화증 환자의 혈청은 *P. gingivalis* HSP60과 인체 HSP60에 동시에 반응하였다<sup>24</sup>. 이것은 *P. gingivalis*와 연관된 동맥경화증의 자가 면역 병인기전에서 세균성 HSP의 연관 가능성을 언급한 다른 보고들과 일치한다<sup>19,25-28</sup>.

이전의 연구에서 *P. gingivalis* HSP에는 반응을 보이고 인체 HSP와는 교차반응하지 않는 *P. gingivalis* HSP에 대한 단클론항체를 확인하였다<sup>29</sup>. 여기서 얻은 이 IgG는 *P. gingivalis*에만 반응을 보이고 치주병원균으로 밝혀진 *P.*

*intermedia*, *F. nucleatum* 및 *A. actinomycetemcomitans* 등에는 교차반응을 보이지 않았다. 이는 다양한 병인균에 기인하는 치주염을 예방하기 위한 백신 후보로서 이 단클론항체가 인지하는 peptide 백신의 유용성에 대한 한계성을 시사하는 것이다. 따라서 치주염 예방백신 전략에 이용할 수 있는 잠재력을 가진 새로운 단클론항체, 즉 다양한 치주병원균과 교차반응하는 단클론항체를 규명하고 이 항체가 인지하는 면역우세 항원결정부위(epitope)를 규명함으로써 백신후보 peptide를 탐색하고자 하는 것이 본 연구의 목적이다.

## 재료 및 방법

### 1. Recombinant *P. gingivalis* HSP60의 정제

*P. gingivalis* 381에서 추출한 HSP60 유전자인 GroEL gene<sup>11</sup>은 일본 Okayama 치과대학의 Yoji Murayama 교수로부터 양도받았다. *P. gingivalis* GroEL 유전자를 pGEX-4T-3 expression vector에 cloning하여 glutathione S-transferase-*P. gingivalis* GroEL fusion construct로 전환시켰다. Fusion construct는 HB-1142세포에 형질전환(transformation)시킨 후, 1M isopropyl  $\alpha$ -D-thiogalactoside(IPTG)를 첨가해서 단백질 발현을 유도했다. 세포를 수거하여 100 mM Triethanolamine-HCl, 170 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM dithiothreitol 이 포함된 용액(pH 7.4)에 재부유시키고 sonication하였다. Triton X-100이 1% 첨가된 Phosphate-buffered saline (PBS)로 2번 세척한 glutathione sepharose 4B beads (Pharmacia, Sweden) slurry를 각 tube에 첨가하고 배양하였다. 침전된 bead들을 Triton X-100이 1% 첨가된 PBS로 조심스럽게 세척하고 재부유하였다. Fusion protein은 elution buffer(10 mM reduced glutathione, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)로 처리하여 추출 정제하였다.

### 2. 생쥐의 immunization

10마리의 C57B/6 생쥐를 대상으로 *P. gingivalis* HSP60을 complete Freund's adjuvant에 혼합하여 피하주사로 (마리당 200 $\mu$ g) 면역시킨 후, incomplete Freund's adjuvant에 혼합하여 1주 간격으로 2회 추가 면역시켰다.

### 3. *P. gingivalis* HSP60에 대한 hybridoma 수립과 단클론항체 형성

2주 후에 경추를 탈골시켜 생쥐를 희생시키고 복강에 작은 절개선을 넣어 비장을 채취하였다. 여기에 serum-free DMEM을 넣고 세포 덩어리를 고르게 분산시켰다. 균일한 세포군집을 얻기 위해 분산된 세포를 30 $\mu$ m nylon mesh (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Germany)에 통과시켰다. 실온에서 원심분리한 후(1500 rpm/5분) 상층부는 버리고 침전된 세포에 혼재된 적혈구를 제거하기 위해 lysing buffer로 5분간 처리하고, serum-free DMEM 배지로 최대한 희석시킨 후 같은 방법으로 세 번 세척하여 세포 수를 측정하였다. 융합 1주전 HAT (Hypoxanthine-aminopterin-thymidine)-sensitive Balb/c mouse의 myeloma cell(SP2/0-Ag14:ATCC #CRL 1581)을 배양하여 serum-free DMEM으로 세 번 세척한 후 세포 수를 측정하였다. 그 후 비장으로부터 채취한 세포와 myeloma cell을 각각 동수로 10ml씩 혼합하여 50% polyethylene glycol을 이용하여 융합을 시행하였다. 융합 후, 세포들은 DMEM-20-/HAT 배지로 희석하여 비융합 세포들을 제거하였다. 다음, 96 well culture plates에 두 방울씩 분주한 다음 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. Hybrid cells의 선택적인 성장이 14일째 이루어졌다. 마지막으로 배지는 HAT 배지를 중화시키기 위하여 DMEM-20-/HT 배지를 두 방울씩 넣었다. 14일 후 세포의 follicle이 단일형으로 균질하게 군집된 well만 선별하여, 세포가 각 well의 25-50%까지 차지하였을 때 각 well의 상층액을 수거하여 *P. gingivalis* HSP60에 대한 항체형성 여부를 판정하기 위해 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 기법을 이용한 anti-*P. gingivalis* HSP60 IgG 항체 역가 측정을 통해 screening을 시행하였다.

### 4. Anti-*P. gingivalis* HSP60 단클론항체(IgG)의 분리 및 정제

배양한 세포 중 *P. gingivalis* HSP60 IgG에 높게 반응한 hybridoma cell을 선별하여 키운 후 nude mouse 복강에 5 $\times$ 10<sup>7</sup>개의 세포를 주사하였다. 약 1개월 후 nude mouse를 희생시켜 복수를 채취하였고 IgG Purification Kit

(ImmunoPure<sup>®</sup>, PIERCE, USA)를 이용하여 anti-*P. gingivalis* HSP60 단클론항체를 분리 정제하였다.

### 5. Western immunoblot 분석

정제한 anti-*P. gingivalis* 단클론항체(IgG)를 이용하여 *P. gingivalis* HSP60과 human HSP60에 대한 Western immunoblot 양상을 분석하였다. *P. gingivalis* HSP60과 human HSP60(StressGen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada)를 SDS-PAGE(전기영동)에 의해 변성 분리하여, 이를 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane (BIO-RAD)에 transfer하였다. 그리고 skim milk와 Tween 20이 각각 5%, 0.1% 포함된 TBS 용액으로 실온에서 1시간동안 막을 blocking하였다. 1차 항체인 TTBS 용액으로 희석한 anti-*P. gingivalis* HSP 단클론항체 IgG를 첨가하여 4°C에서 12시간 동안 배양하였다. 세척 후 2차 항체인 HRP가 결합된 mouse anti-goat IgG(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)를 희석하여 첨가하였으며, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후 membrane을 TTBS로 3회 세정하여 TMB Membrane Peroxidase Substrate System(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)으로 발색되게 하였다. 또한 이전에 분리한 IgG를 1차 항체로 하여 4종류의 상이한 치주병인균의 HSP에 대한 교차반응을 확인하기 위해 Western immunoblot을 실시하였다. 간단히 설명하면, *P. gingivalis* 381, *P. intermedia* ATCC 25611, *F. nucleatum* ATCC 10953, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384를 배양한 후, 44°C에서 1시간 동안 열충격을 가하였다. 배양한 세균을 세척한 후 cell pellet에 lysing buffer를 넣고 섞은 다음 배양액이 맑아질 때까지 sonication한 후 재 세척 후 상층액만 사용하여 sample buffer와 섞었다. 그 후 앞에서 정제한 anti-*P. gingivalis* HSP 단클론항체(IgG)를 사용하여 동일한 방법으로 Western immunoblot 양상을 분석하였다.

### 6. 치주 병소조직을 이용한 면역조직화학적 연구 (immunohistochemistry)

실험군은 치주염환자 4명, 대조군은 건강한 환자가 선정되었다. 치주염에 이환된 환자의 치주낭과 치주결합조직을 포함한 치주 병소조직을 치은변연부로부터 약 3~4 mm 채

취하여 OCT compound(Sakura Finetek, Tokyo, Japan)에 넣고 액화질소에 급냉시킨 후 보관하였다. Cryostat를 이용하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 원하는 10 m 크기로 절단하여 coating된 slide에 자른 조직을 붙인 후 건조시켰다.  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 차가운 acetate에 담구어 slide를 고정시킨 후  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 내인성 peroxidase의 반응을 제거하기 위해 조직을 0.3% 과산화수소수에 넣어 20분간 실온에 방치하였다. 이후 조직을 0.02 M PBS로 세척한 후에 비특이적인 면역반응을 방지하기 위해 2% BSA를 사용하여 humidified chamber에서 30분 동안 반응시켰다. Blocking solution를 제거한 뒤 1차 정제된 단클론항체 IgG를 반응시킨 후, 실온에서 PBS로 세척하였다. Biotinylated anti-mouse IgG (Vector Laboratories)를 실온에서 1시간 동안 배양하고, 세척한 후 avidin-biotin complex(ABC, Vectastatin Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 용액으로 넣어 실온에서 배양한 후, 세척하고 diaminobenzidin (DAB) substrate kit(Vector Laboratories)를 이용하여 광학현미경(Carl Zeiss Axioskop 2) 하에서 확인하면서 착색 반응을 시행하였다. 반응이 끝난 후 세척하고, 알코올과 xylene으로 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 Entellan (Merck, Darmstadt, Germany)으로 봉입하여 광학현미경으로 면역반응을 관찰하였다.

## 7. Synthetic peptide의 제작 및 Western immunoblot 분석

*P. gingivalis* GroEL의 모든 amino acid sequence를 spanning한 총 37 decapeptide를, Fmoc chemistry에 기초한 제조자의 지시서에 따라서, Epitope-Scanning Kit (Chiron Mimotopes, Clayton, Victoria, Australia)를 이용하여 합성하였다. Peptides는 20개의 amino acid가 합성이 되어 이루어졌는데, 5개의 amino acid residue가 겹쳐 지도록 도안이 되었다. 합성의 정확성은 양성(PLAQ) 또는 음성(GLAG)대조 peptide를 동시에 합성하고, 또한 후에 monoclonal antibody를 첨가하여, 결합되는 것을 검사함으로써 확인하였다.

4개의 상이한 anti-*P. gingivalis* HSP60 단클론항체가 인지하는 합성 peptide를 규명하기 위해 *P. gingivalis* HSP60의 합성 peptide(StressGen Biotechnologies, Victoria,

BC, Canada)에 대한 Western immunoblot을 상기한 방법과 동일하게 시행하였다.

## 8. 면역우세 peptide 항원에 대한 단클론항체의 인지 분석을 위한 ELISA assay

Microtiter plate(Covalink plate, NUNC, Denmark)에 synthetic peptide를 부착하기 위해 용해성 1-ethyl-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide(EDC)와 N-hydroxy-succinamide(NHS)를 첨가하였다. EDC와 NHS는 0.1 M의 농도로 사용하였다. 각 peptide(2,19,29번)는 소량의 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 용해하고, 0.1M carbonate-bicarbonate로 희석하여 1000 $\mu\text{l}$ 가 되게 하였다. 75  $\mu\text{l}$ 의 표본을 well의 바닥부에 조심스럽게 주입하고, plate는 상온에서 하룻밤동안 유지하였다. 상층부를 제거하고, plate는 증류수로 5회 세척하고, 상온에서 건조시켰다. plate를 밀봉하고  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

Conjugated plate(2번 peptide, 5 mg/ml)를 PBST로 세척하고, 희석된 Anti-*P. gingivalis* HSP 단클론항체 IgG를 첨가하여 배양하였다. 세척 후, 2차 항체인 HRP가 결합된 mouse anti-goat IgG(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)를 희석하여 첨가하였으며,  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 배양하였다. 이후, plate를 세척하고 TMB Membrane Peroxidase Substrate System (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)으로 발색 후 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 450 nm의 파장에서 광학 흡광도를 측정하였다. 19번과 29번 peptide도 동일하게 ELISA assay를 시행하였다. 각각의 표본에서 peptide에 대한 ELISA 지표의 광학 흡광도 평균과 표준편차를 계산하였다. 평균 $\pm 3 \times$  표준편차를 기준으로 하여 peptide의 각 지표를 양성/음성으로 판정하였다.

## 결과

### 1. Recombinant *P. gingivalis* HSP60의 정제

Recombinant *P. gingivalis* HSP60은 SDS-PAGE방법으로 분자량의 무게와 순도를 확인하였다. 정제된 결과 60 kDa의 분자량을 가지는 HSP가 얻어졌고, SDS-PAGE로 전기영동한 바 단일 band로 순도를 확인할 수 있었다(Fig. 1).

## 2. Anti-*P. gingivalis* HSP60 단클론항체(IgG)의 분리 및 정제

배양한 세포 중 *P. gingivalis* HSP60 IgG에 높게 반응한  
4개의 상이한 hybridoma cell을 선별하여 키운 후 nude

mouse 복강에  $5 \times 10^7$ 개의 세포를 주사하였다. 약 1개월 후  
nude mouse를 희생시켜 복수를 채취하였고 IgG  
Purification Kit(ImmunoPure<sup>®</sup>, PIERCE, USA)를 이용하  
여 anti-*P. gingivalis* HSP60 단클론항체를 분리 정제하였  
다(Fig. 2).

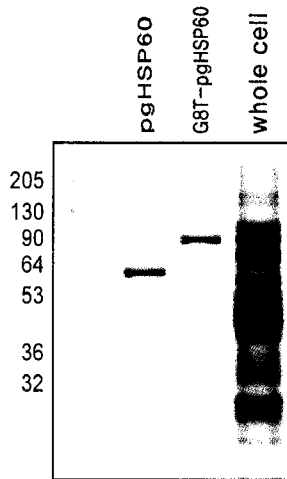


Figure 1. SDS-PAGE analysis of the recombinant *P. gingivalis* HSP60. (M: molecular mass)

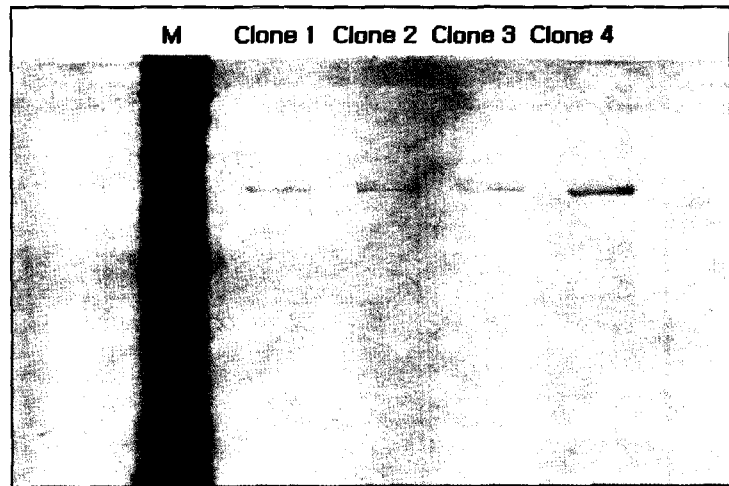


Figure 2. SDS-PAGE analysis of the anti-*P. gingivalis* HSP60 IgG antibody. (M: molecular mass) Four different hybridomas were cloned producing monoclonal IgG antibodies exclusively to *P. gingivalis* HSP60.

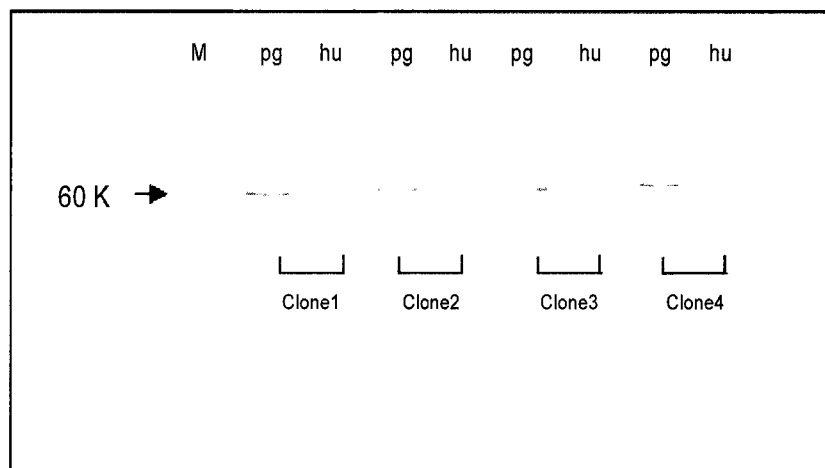


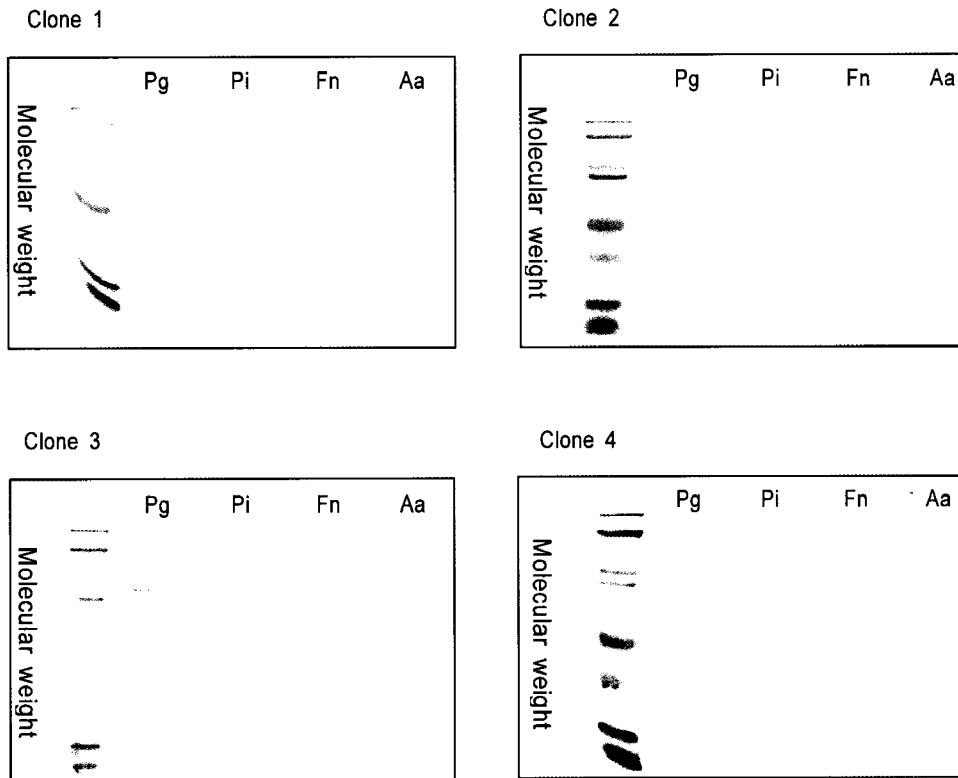
Figure 3. Western immunoblot patterns of *P. gingivalis* HSP60 and human HSP60 of the four monoclonal antibodies. Four monoclonal antibodies recognized and reacted with *P. gingivalis* HSP60. (M: molecular weight marker, pg: *P. gingivalis* HSP, hu: human HSP).

### 3. Western immunoblot

4개의 상이한 단클론항체를 이용하여 *P. gingivalis* HSP60와 인체 HSP60에 대한 반응성을 실험한 결과 4개 항체 모두 *P. gingivalis* HSP60에 반응하였으나 인체 HSP60에는 교차반응하지 않는 특이성을 보였다(Fig. 3). 얻어진 4개의 *P. gingivalis* 단클론항체의 상이한 세균에 대한 교차반응성 여부를 평가하고자 네 종류 치주병인균의 HSP60에 대한 Western immunoblot을 시행한 결과 4개의 단클론항체 모두 *P. gingivalis*에만 반응하고 사용된 다른 3종의 치주병인균의 HSP에는 교차반응을 보이지 않았다(Fig. 4).

### 4. 치주병소조직을 이용한 면역조직화학적 분석

*P. gingivalis* HSP의 치주병소 내 분포를 평가하기 위해 4개의 단클론항체를 이용하여 면역조직화학분석을 시행한 결과 4종류의 단클론항체 모두 건강한 치주조직에 비해 치주병소조직에서 높은 반응성을 보여주었다(Fig. 5).



Pg : *P. gingivalis*  
 Pi : *P. intermedia*  
 Fn : *F. nucleatum*  
 Aa : *A. actinomycetemcomitans*

**Figure 4.** Western immunoblot patterns of four monoclonal antibodies reacting with HSP60 of four different periodontopathogenic bacteria. Four monoclonal antibodies were recognized and reacted with *P. gingivalis* HSP60.

5. Synthetic peptide의 Western immunoblot 분석

*P. gingivalis* HSP60의 amino acid를 합성하여 37개의 synthetic peptide를 제작하였다. 5개의 amino acid residue가 겹쳐지도록 20개의 amino acid가 합성되었다 (Table. 1). Western immunoblot을 통해 synthetic peptide에 대한 단클론항체의 반응을 조사하였는데, no. 19, no. 29 peptide가 단클론항체가 인지하는 면역우세 항원결

정부위로 인지되었다. no. 19 peptide는 4번째 단클론항체에, no. 29 peptide는 4개의 단클론항체 모두에 반응하여 발색되었다(Fig. 6). no. 19 peptide는 *P. gingivalis* HSP60 sequence가 TLVVNRLRGSLKICAVKAPG이었고, no. 29 peptide는 TVPGGGTTYIRAIAALEGLK이었다.

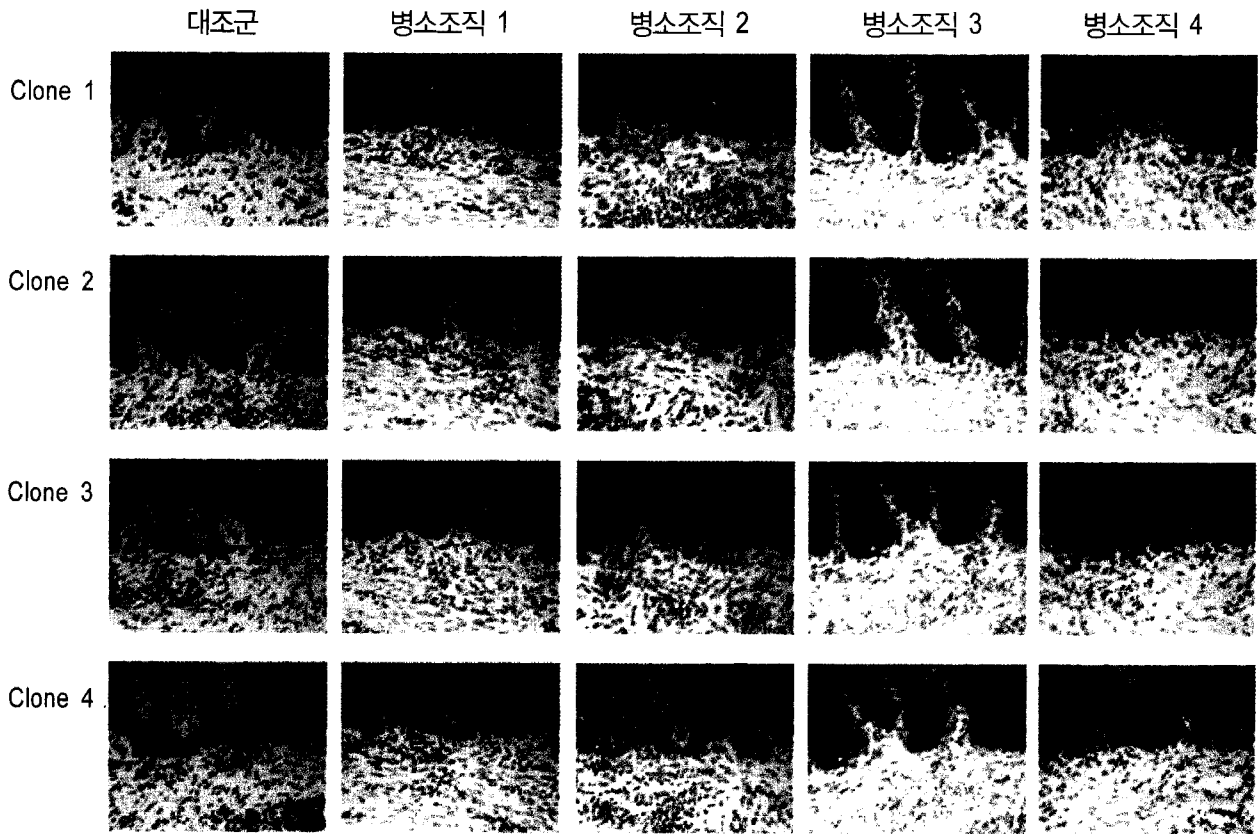


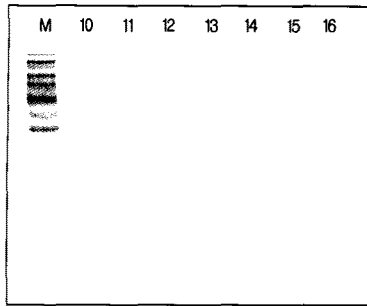
Figure 5. Immunohistochemistry to identify the localization of the *P. gingivalis* HSP in the diseased gingival tissue. Four monoclonal antibodies were highly reacted with the diseased gingival tissue than healthy periodontal tissue. (control group: healthy periodontal tissue)

Table 1, List of Synthetic Peptide Numbers and Their Amino Acid Sequence.

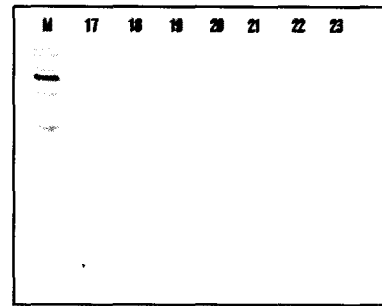
Peptide number	Position	Sequence	
1	1-10	MAKEIKFDME	10
2	6-25	KFDMESRDLLKKGVDALPNA	20
3	21-40	ALPNAVKVTLGPKVRNVILS	20
4	36-55	NVILSKTYGA PHITKDGVSV	20
5	51-70	DGVSVAKEIELECPFENMGA	20
6	66-85	ENMGAQLVKEVASKTND DAG	20
7	81-100	NDDAGDGGTTTATILAQSIIG	20
8	96-115	QSIIGVGLKNVTAGANPMDL	20
9	111-130	NPMDLNRGIDKSVKSVVTHI	20
10	126-145	VVTHIAGMAKEV GADFQKIE	20
11	141-160	FQKIEHVAKISANGDENIGS	20
12	156-175	ENIGSLIAEAMRKVKKEGVI	20
13	179-198	KEGVITVEEAKGDTTVEVV	20
14	194-213	TVEVVEGMQFDRGYISPYFV	20
15	209-228	SPYFVTNTDKMEVQMPFI	20
16	224-243	ENPFILYDKKISVLKEMLP	20
17	239-258	KEMLPILEQTVQTGKPLLI	20
18	254-273	PLLI AEDNDSEALPTLVVN	20
19	269-288	TLVVNRLRGLKICAVKAPG	20
20	284-303	VKAPGFGRRKAMLEDIAIL	20
21	299-318	DIAIL TGGAVISEETGLNLE	20
22	314-333	GLNLENTTMDMLGTAEKVRV	20
23	329-348	EKVRVDKNTTIVNGAGNKE	20
24	344-363	AGNKEGIASRITQIKAQIEN	20
25	359-378	AQIENTTSDYDREKLQERLA	20
26	374-393	QERLAKLAGGVAVLYVGAAS	20
27	389-408	VGAASEVEMKEKKDRVEDPL	20
28	404-423	VEDPLSPTRPPIEEGTVPGG	20
29	419-438	TVPGGGTTYIRAIAALEGLK	20
30	434-453	LEGLGENEDET TGIEIVKR	20
31	449-468	EIVKRAIEEPLRQIVANAGK	20
32	464-483	ANAGKEGAVMVQVKEGKDD	20
33	479-498	EGKDDFGYNARTDVFENLYT	20
34	494-513	ENLYTTGVIDPAKVTRVALE	20
35	509-528	RVALENAASIAGMFLTTECV	20
36	524-543	TTECVIADKKEDNPAAPAMP	20
37	539-558	APAMPGMGGMGMM	15



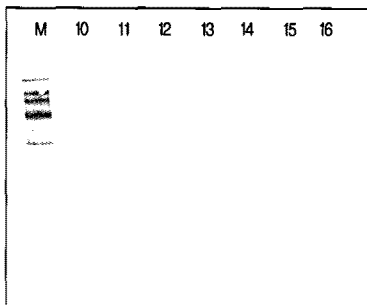
clone 1



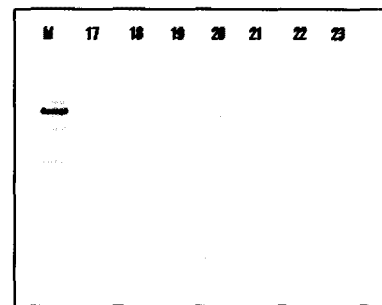
clone 1



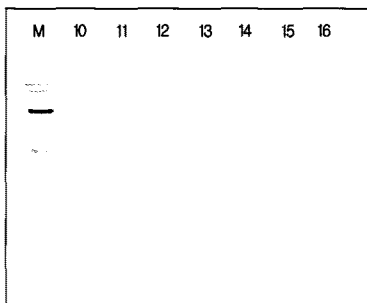
clone 2



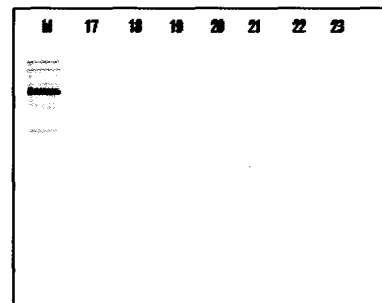
clone 2



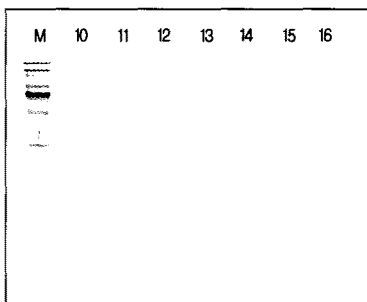
clone 3



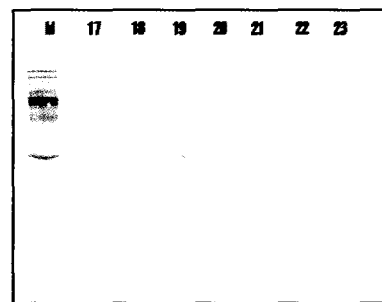
clone 3



clone 4



clone 4



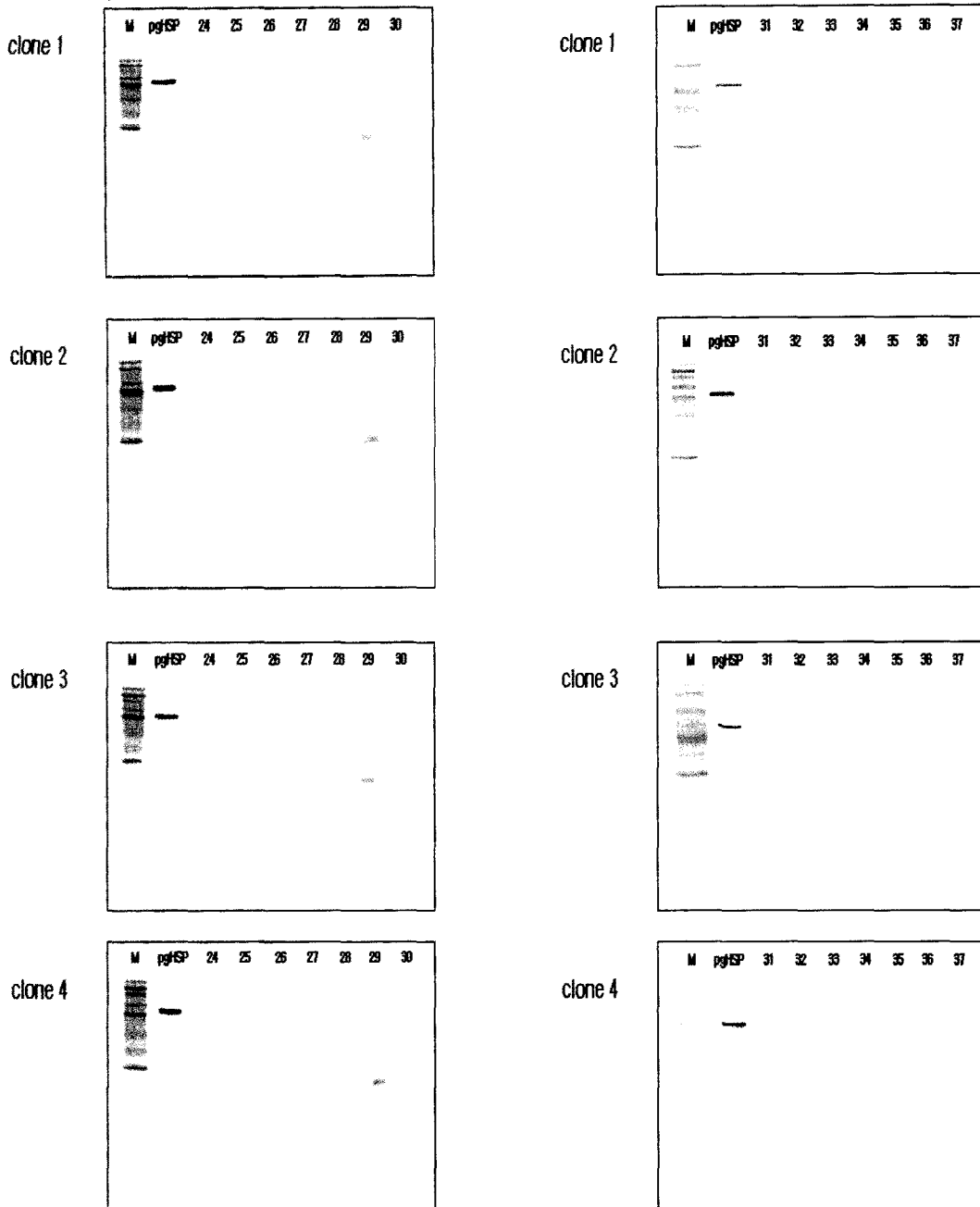


Figure 6. Western immunoblot patterns of the synthetic peptide, Peptide #29 and #19 were recognized by all or one of the four monoclonal antibodies that reacted solely with *P. gingivalis* HSP60.

### 6. 면역우세 peptide 항원에 대한 단클론항체의 인지 분석

Peptide conjugated plate에 4개의 단클론항체를 첨가하여 ELISA를 시행한 결과, 면역우세 peptide 항원(no.19, no.29)에 대해 4종류의 단클론항체가 높은 양성반응을 보여주었다.

### 고찰

HSP는 매우 보존적이고, HSP60의 경우 세균과 인체 간에 약 60%의 배열 상동성이 관찰되었다<sup>31)</sup>. HSP60은 많은 세균간의 공통항원으로 발견되었고<sup>9)</sup>, 치주병인균 중에서 상호작용(교차반응)은 보고된 바 있다<sup>10)</sup>. 그러므로, 보존된 서열에 대한 특이성을 가진 T세포와 항체는 잠재적으로 자가

반응하고, 감염성 질환의 병인론에 영향을 미칠 수 있다<sup>32)</sup>. 또한, 주요 치주 병인균에서 HSP DNA sequence가 밝혀졌다<sup>11-14,16)</sup>. 세균의 HSP에 대한 T세포 면역반응은, 포유동물의 HSP를 표적으로 하는 자가면역을 유도함으로써<sup>28)</sup> 치주 질환의 자가면역병리학적 기전에 관여할 수 있다<sup>22,23,25,27)</sup>.

*P. gingivalis* HSP60은 치주염 및 동맥경화증의 자가 면역 병인기전을 조절함에 있어서 중요한 역할을 하는데, 이것은 세균성 HSP가 인체 HSP와 높은 배열 상동성을 공유하기 때문이다. 치주염 환자에서 *P. gingivalis* HSP60에 대한 항체반응이 증가한 것은 *P. gingivalis* HSP60이 치은 섬유모세포와 혈관내피세포를 표적으로 하는 치주 조직의 자가 면역성 파괴에 관여할 가능성을 보여주는 것이다<sup>19)</sup>.

그러므로 감염성 치주백신 전략의 개발에 있어서 자가면역반응의 위험성을 배제하기 위해서는 인체 HSP에 반응하지 않고 오로지 상동의 bacteria에 반응하는 *P. gingivalis* HSP60 단클론항체의 면역우세 항원결정부위(immunodominant epitope)를 확인하는 것이 중요하다. 이 전략은 *P. gingivalis*의 감염으로 야기된 치주질환을 예방하는 백신전략이 될 수 있기 때문이다.

본 연구는 *P. gingivalis* HSP60에 단독반응하는 anti-*P. gingivalis* HSP60 단클론항체에 특별히 인지되어지는 peptide를 규명하였다. 4개의 다른 hybridomas가 clone되었는데 이들은 각각 *P. gingivalis* HSP에 대한 단클론 IgG 항체를 생성하였다. 37개의 synthetic peptide(5개의 amino acid가 겹쳐지는 20개씩의 아미노산)가 합성되어졌다. 이 모든 peptide는 immunoblot 분석을 위해 SDS-PAGE로 전기영동하여졌고, 그 결과 no.19 peptide는 4번째 클론이, no.29 peptide는 4개의 클론 모두가 인지하였다. no. 19 peptide의 sequence는 TLVVNRLRGS LKICAVKAPG이었고, no. 29 peptide의 sequence는 TVPGGGTTYIRAIAALEGLK이었다. 이들의 peptide의 sequence를 분석하여, 치주염 환자와 동맥경화증 환자 등 전신질환자의 *P. gingivalis* HSP60에서 확립된 항원결정부위와 일치하는 것이 있는지 검증하였다. Choi 등<sup>24)</sup>은 동맥경화증환자에서 *P. gingivalis* HSP60 분자에서 spanning된 108의 overlapping synthetic peptide 중에서 T세포와 B세포에 공통적으로 항원결정부위 특이성을 나타내는 10개의 peptide를 확인한 바 있다. 한편 Maeda 등<sup>30)</sup>은 치주질환자에서 *P. gingivalis*

HSP60 분자의 84개의 decapeptide를 합성하여, 18개의 B 세포 항원결정부위를 확인하였다. 이것은 자가면역반응을 trigger하는 *P. gingivalis* HSP60의 잠재력을 규명하는데 중요하다. no. 29와 no. 19 peptide는 Choi 등<sup>24)</sup>의 연구 결과에서 밝혀진 항원결정부위 peptide GTTYIRAIAA, LVVNRLRGS L과 일치하였고, Maeda 등<sup>30)</sup>의 peptide GTTYIRAIAALEGLK, TLVVNRLRGS L과 일치하였다. 따라서 *P. gingivalis* HSP60에 단일반응하는 anti-*P. gingivalis* HSP60 단클론항체에 의해 인지되는 면역우세 항원결정부위 peptide는 no. 19, no. 29 peptide로 귀결되고, 과거의 다른 연구들<sup>24,30)</sup>에서 보여준 치주질환과 동맥경화증의 B세포 항원결정부위로 확인되었다.

*P. gingivalis* HSP의 치주병소 내 분포를 평가하기 위해 4개의 단클론항체를 이용하여 면역조직화학분석을 시행한 결과 4종류의 단클론항체 모두 건강한 치주조직에 비해 치주병소조직에서 높은 반응성을 보여주었다. 이는 *P. gingivalis* HSP60 peptide(TVPGGGTTYIRAIAALEGLK)가 치주질환의 면역학적 병인과정에 밀접한 관련이 있다는 것을 밝혀주는데, 이 no. 29 peptide는 향후 *P. gingivalis*-감염성 치주질환의 예방 백신으로 이용될 수 있는 잠재력을 지닌다.

본 연구에서 수립한 *P. gingivalis* HSP60에 대한 단클론항체는 *P. gingivalis* HSP60에만 단독반응을 보이고 인체 HSP60와는 교차반응하지 않는 장점을 가지나, 타종의 치주 병원균으로 밝혀진 *P. intermedia*, *F. nucleatum* 및 *A. actinomycetemcomitans* 등에도 교차반응을 보이지 않았다. 이는 단클론항체가 인지하는 peptide 백신이 다양한 병원균에 기인하는 복합감염으로서의 치주염 예방하기 위한 백신후보로서의 유용성에 한계를 가지고 있음을 시사하나, 적어도 본 연구의 한계성내에서는 *P. gingivalis*-감염성 치주염을 예방하는 백신용 peptide로 제시될 수는 있을 것 같다.

따라서 치주염 예방백신 전략에 이용할 수 있는 잠재력을 가진 새로운 단클론항체, 즉 복합 치주병원균과 상호작용하는 단클론항체를 규명하는 연구가 향후 보완되어야 할 것이다. 즉, 인체 HSP에 비교차반응성을 유지하면서 *P. gingivalis* HSP와 다른 치주병원균에 교차 반응하는 단클론항체를 생성하고, 이 단클론항체가 인지하는 peptide를 규명하는 연구가 진행되어야 잠재력 있는 차세대 예방백신으로 이용될 수 있을 것이다.

## 참고문헌

- Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* 1991;62:59-73.
- Choi JI, Schifferle RE, Yoshimura F, Kim BW. Capsular polysaccharide- fimbrial protein conjugate vaccine protects against *Porphyromonas gingivalis* infection in SCID mice re-constituted with human peripheral blood lymphocytes. *Infect Immun* 1998;66:391-393.
- Taubman MA, Yoshie H, Wetherell JR, Ebersole JL, Smith DJ. Immune response and periodontal bone loss in germ free rats immunized with and infected with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* 1983;18:393-401.
- Genco CA, Kapczynski DR, Cutler CW, Arko RJ, Arnold RR. Influence of immunization on *Porphyromonas gingivalis* colonization and invasion in the mouse chamber model. *Infect Immun* 1992;60:1447-1454.
- Rajakpse PS, Obrien-Simpson NM, Slakeski N, Hoffman B, Reynolds EC. Immunization with the RgpA-Kgp protei-nase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis* protects against bone loss in the rat periodontitis model. *Infect Immun* 2002;70:2480-2486.
- Podmore M, Ebersole JL, Kinane DF. Immunodominant anti-gens in periodontal disease: a real or illusive concept? *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12:179-185.
- Page RC. The humoral response in patients with perio-dontitis: Effects of treatment and prospects for a vaccine. *Compend Conti Educ Dent Suppl* 1994;18:666-671.
- Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of de-structive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1998;15: 316-323.
- Shinnick TM. Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;167:145-160.
- Hinode D, Nakamura R, Grenier D, Mayrand D. Cross-re-activity of specific antibodies directed to heat shock pro-teins from periodontopathogenic bacteria and of human origin. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:55-58.
- Maeda H, Miyamoto M, Hongyo H, Nagai A, Kurihara H, Murayama Y. Heat shock protein 60(GroEL) from *Porphyromonas gingivalis*: molecular cloning and sequence analysis of its gene and purification of recombinant protein. *FEMS Microbiol Lett* 1994;119:129-135.
- Minami J, Matsumoto S, Yamada T. Putative heat shock protein 70 gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: molecular cloning and sequence analysis of its gene. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:113-119.
- Tsai JP, Shi W. Analysis of gene expression in *Treponema denticola* with differential display polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:305-308.
- Skar CK, Bakken V. The heat shock response of *Fusobacterium nucleatum*. *Eur J Oral Sci* 2001;109:402-408.
- Hinode D, Yoshioka M, Tanabe S, Miki O, Masuda K, Nakamura R. The GroEL-like protein from *Campylobacter rectus*: immunological characterization and interleukin-6 and -8 induction in human gingival fibroblast. *FEMS Microbiol Lett* 1998;167:1-6.
- Kadri R, Devine D, Ashraf W. Purification and functional analysis of the DnaK homologue from *Prevotella intermedia* OMZ 326. *FEMS Microbiol Lett* 1998;167:63-68.
- Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence fac-tors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 1999;20: 168-238.
- Choi JI, Chung SW, Kang HS, Rhim BY, Kim SJ, Kim SJ. Establishment of *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein-specific T-cell lines from atherosclerosis patients. *J Dent Res* 2002;81(5):344-348.
- Choi JI, Kang HS, Park YM, Kim SJ, Kim US. Identification of T-cell epitopes of *Porphyromonas gingivalis* heat-shock-protein 60 in periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:1-5.
- Choi JI, Choi KS, Yi NN, Kim US, Choi JS, Kim SJ. Recognition and phagocytosis of multiple periodontopatho-genic bacteria by anti-*Porphromonas gingivalis* heat-shock protein 60 antisera. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:51-55.
- Ishihara K, Ando T, Kosugi M, Morimoto M, Yamane G, Takahashi S, Ogiuchi H, Okuda K. Relationships between the onset of pustulosis palmaris et plantaris, periodontitis and bacterial heat shock proteins. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:232-237.
- Ando T, Kato T, Ishihara K, Ogiuchi H, Okuda K. Heat shock proteins in the human periodontal disease process. *Microbiol Immunol* 1995;39:321-327.
- Lopartin DE, Shelburne CE, Van Poperin N, Kowalski CJ, Bagramian RA. Humoral immunity to stress proteins and

- periodontal disease. J Periodontol 1999;70:1185-1193.
24. Choi JI, Chung SW, Kang HS, Rhim BY, Park YM, Kim US, Kim SJ . Epitope mapping of *Porphyromonas gingivalis* heat-shock protein and human heat-shock protein in human atherosclerosis. J Dent Res 2004;83(12):936-940.
  25. Yamazaki K, Ohsawa Y, Tabeta K, Ito H, Ueki K, Oda T, Yoshie H, Seymour GJ. Accumulation of human heat shock protein 60-reactive T cell in the gingival tissues of periodontitis patients. Infect Immun 2002;70:2492-2501.
  26. Hansson GK. Immune mechanism in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001;21:1876-1890.
  27. Ueki K, Tabeta K, Yoshie H, Yamazaki K. Self-heat shock protein 60 induces tumour necrosis factor-alpha in monocyte-derived macrophage : possible role in chronic inflammatory periodontal disease. Clin Exp Immunol 2002;127:72-77.
  28. Wick G, Perschinka H, Millonig G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. Trends Immunol 2001;22:665-669.
  29. Lee NN, Lee JY, Kim SJ, Choi JI. Development of monoclonal antibody against Porphyromonas gingivalis heat shock protein. J Korean Acad Periodontol 2007;37:11-21.
  30. Maeda H, Miyamoto M, Kokeguchi S, Kono T, Nishimura F, Takashiba S, & Murayama Y. Epitope mapping of heat shock protein 60(GroEL) from Porphyromonas gingivalis. FEMS Immunol Med Microbiol 2000;28:219-224.
  31. Jindal S, Dudani AK, Singh B, Harley CB, & Gupta RS. Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilo Dalton mycobacterial antigen. Mol Cell Biol 1989;9:2279-2283.
  32. Lamb JR, Bal V, Mendez-samperio P, Mehlert A, So A, Rothbard J, Jindal S, Young RA, & Young DB. Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. Int Immunol 1989;1:191-196.

